

研究報文

タンパク質酸化を指標とした茶飲料の抗酸化および酸化促進作用

中川 一夫, 木水 綾子, 吉見 有加, 土坂 愛, 林 由佳

Antioxidant and pro-oxidant actions of tea beverages
on the formation of protein carbonyl

Kazuo Nakagawa, Ayako Kimizu, Yuka Yoshimi, Ai Tsutisaka and Yuka Hayashi

Abstract

The ready-to-drink tea beverages from the market were examined to assess their pro-oxidant activities by incubating with bovine serum albumin in the presence of 10 mM 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), a water-soluble free radical initiator, or 0.1 mM CuCl₂ in sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C for 90 min. Protein carbonyl was measured as an index of protein oxidation. In the presence of AAPH, several green tea beverages reduced the formation of protein carbonyl possibly by scavenging free radicals, whereas oolong tea and black tea enhanced the protein carbonyl formation. In the presence of Cu²⁺ ions, all tea beverages examined in this study largely increased protein carbonyl content. Additionally catechins oxidized by tyrosinase increased the protein carbonyl formation. These results indicate that oxidized catechins and their derivatives, which are rich in oolong tea and black tea, may be responsible for the protein carbonyl formation.

(Received September 21, 2010)

I はじめに

ツバキ科の茶 (*Camellia sinensis*) の葉を原料とする飲料は世界でひろく利用されており、茶飲料は製法により不発酵茶の緑茶、半発酵茶の烏龍茶、発酵茶の紅茶に大別される。このほか微生物発酵を利用したプアール茶など各地に特色のある茶が供されている。茶飲料は日常的に消費される嗜好飲料ではあるが、近年、抗腫瘍作用、血圧上昇抑制作用、血糖上昇抑制作用、抗菌作用など様々な保健機能を有する食品として注目されている^{1) 2)}。茶葉に含まれる化学成分はカフェインやポリフェノール類など多数の成分があり、さらに製造時における茶葉中ポリフェノールオキシダーゼによる酸化もあって茶飲料の種類によって組成は大きく異なる。茶飲料の摂取

によりもたらされる保健機能がいずれの成分に帰せられるかは未だ明らかではないが、ヒトにおける疫学的調査により生体作用の一部はカテキン類が関与する可能性が指摘されている³⁾。

カテキン類については抗酸化作用がよく知られているが、カテキン類がCu²⁺イオンと共存すると酸化促進作用をもたらしてDNAを酸化的に傷害すること^{4) 5)}、あるいは活性酸素種を生成して肝細胞毒としてはたらくこと⁶⁾が報告されている。このようなカテキン類のもつ抗酸化性と酸化促進性の二面的な作用について、著者らも既に*in vitro*実験でのタンパク質酸化において報告した⁷⁾。今回は、市販ペットボトル入り茶飲料を用いて*in vitro*実験でのウシ血清アルブミンの酸化に対する効果を検討した。実験条件としてはフリーラジカル発生剤添加条件とCu²⁺イオン添加条件を選び、緑茶系、烏龍茶系、紅茶系およびその他の茶飲料の効果の違いを検討し

た。茶飲料にはカテキン類だけでなくその酸化体や重合体など多種類のポリフェノール類が含まれているので、総ポリフェノール含量を測定して酸化との関連を考察した。

II 実験方法

1. 試薬

2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) は和光純薬工業(大阪)から購入し、Folin-Ciocalteu 試薬はナカライテスク(京都)から購入した。チロシナーゼはマッシュルーム由来(Sigma-Aldrich社製)を用いた。

2. タンパク質中カルボニル基の測定

水溶性フリーラジカル発生剤のAAPH又は Cu^{2+} イオン存在下におけるタンパク質中カルボニル基量生成に対する茶飲料添加の影響を *in vitro* で検討した。タンパク質中のカルボニル基量は、B. Z. Zhuら⁸⁾の方法により定量した。

脂肪酸不含ウシ血清アルブミン(1.25mg/ml 100 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)) 2.4 ml に試料液 0.3 ml および 100 mM AAPH 溶液または 1 mM CuCl_2 溶液 0.3 ml を加え、37℃で90分間インキュベートした。遠心管に反応液 1.0 ml をとり、10 mM 2,4-dinitrophenyl hydrazine /2.5 M HCl 溶液 0.5 ml を加えてよく混和した。60分後に20%トリクロロ酢酸溶液 0.5 ml を加え、水中に10分間おいた後、3,000 xg で10分間遠心分離した。沈殿をエタノール/酢酸エチル混液で3回洗った後、6 M guanidine hydrochloride 溶液 2 ml で溶解し、370 nm で吸光度を測定した。溶液中のカルボニル基量は、分子吸光係数 $22,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて求めた。

3. 茶飲料の総ポリフェノール量の測定

茶飲料に含まれる総ポリフェノール量は、V. L. Singleton & J. A. Rossiの方法⁹⁾を改変したY. Kondoらの方法¹⁰⁾により定量した。

試料液 0.5 ml に Folin-Ciocalteu 試薬 2.5 ml を加えてよく混和し、5分間放置した。10% Na_2CO_3 溶液 2 ml を加え、その後時々混ぜながら60分間放置した後、765 nm で吸光度を測定した。フェノール化合物の標準物質として没食子酸を用い、試料液中の総ポリフェノール量は没食子酸量に換算して表した。

4. ウシ血清アルブミン中 SH 基量の測定

ウシ血清アルブミンはその34番目のアミノ酸残基としてシステインを持ち、このタンパク質の示す還元性の基となっている。カテキン類をマッシュルーム由来チロシナーゼ(EC 1.14.18.1)により酸

化し、アルブミン中システインのSH基量をEllman法¹¹⁾により測定した。

100 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)に溶かした脂肪酸不含ウシ血清アルブミン(3.75 mg/ml)液 2.4 ml にカテキン溶液(1 mM) 0.3 ml、チロシナーゼ溶液 0.3 ml (150 units)を加えて37℃で90分間インキュベートした。反応液 1.0 ml に 0.25 M tris (hydroxymethyl) aminomethane-20 mM EDTA 緩衝液(pH 8.2) 1.1 ml、10 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) 溶液 40 μl を加えて室温で15分間放置し、412 nm で吸光度を測定した。分子吸光係数 $13,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いてSH基濃度を算出した。また、SH基定量に用いた反応液中アルブミンに含まれるカルボニル基量を前述の方法により定量した。

III 実験結果および考察

検体には京都市内で市販されているペットボトル入り茶飲料を任意に選び、測定に用いた。茶飲料は原材料に緑茶抽出物を用いたもの(緑茶飲料)5製品(GT1~GT5)、烏龍茶抽出物を用いたもの(烏龍茶飲料)2製品(OT1およびOT2)、紅茶抽出物を用いたもの(紅茶飲料)1製品(BT1)、多種類の植物抽出物を用いたもの(混合茶飲料)2製品(MT1およびMT2)を検体とした。

著者らは既に市販茶飲料が *in vitro* においてフリーラジカルを消去し、その消去活性は茶飲料に含まれるポリフェノール量と高い相関性を持つことを報告した¹²⁾。そこでフリーラジカル発生剤のAAPHをウシ血清アルブミン溶液に添加して90分間インキュベートし、アルブミンに生じるカルボニル基量への茶飲料の影響を検討した(図1)。10 mM AAPH 添加によりタンパク質カルボニル基量は約1.5倍に増加する実験条件であったが、緑茶飲料にはカルボニル基の増加を抑制するものがみられ、特にGT1, GT2, GT3およびGT5は顕著にカルボニル基の増加を抑制した。しかし、GT4には抑制効果は認められなかった。半発酵茶である烏龍茶のOT1には抑制効果はみられず、OT2は逆にカルボニル基量を大きく増加させた。発酵茶である紅茶飲料のBT1にも顕著なカルボニル基量増加効果が認められた。一方、混合茶系のMT1およびMT2はいずれも、AAPHによるカルボニル基量の増加に対して無影響であった。フリーラジカルによるタンパク質の酸化についてはE. R. Stadtmanの報告¹³⁾があり、いくつかの緑茶飲料でみられたカルボニル基生成抑制はラジカル消去効果に基づくものと思われる。

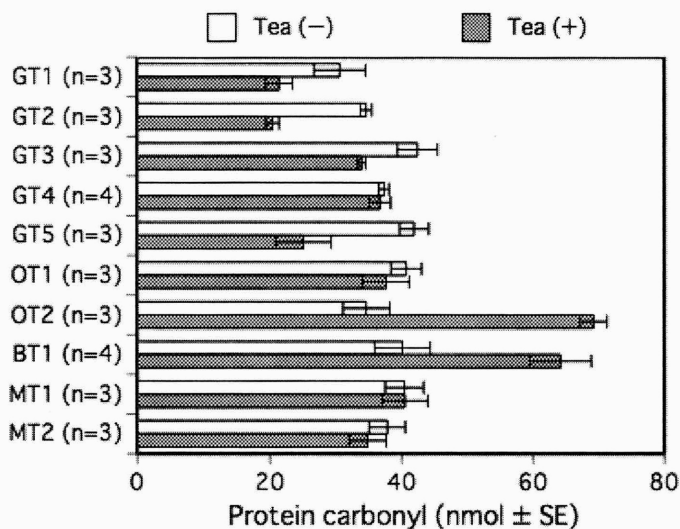


図1 AAPHにより増加したウシ血清アルブミン中カルボニル基に対する茶飲料添加の効果

カルボニル基量はウシ血清アルブミンに含まれる総量を示す。GT, OT, BT, MTはそれぞれ緑茶飲料, 烏龍茶飲料, 紅茶飲料, 混合茶飲料を表す。

先に報告した茶飲料のフリーラジカル消去効果を調べた成績においては、茶飲料中のポリフェノール量とフリーラジカル消去効果との間には高い相関性がみられた。そこで、本報告においても茶飲料中ポリフェノール量とタンパク質カルボニル基量との相関性を検討した(図2)が、両者間には相関性は認められなかった。また、顕著なフリーラジカル消去効果を示した烏龍茶飲料や紅茶飲料¹²⁾がタンパク質カルボニル基の生成を促進したことから、ポリフェノールによるフリーラジカル消去に起因するタンパク質酸化の抑制を超える酸化促進因子がこれらの茶飲料中に存在することを示す。最近、T. Ishiiら¹⁴⁾は、カテキン類のヒト血清アルブミン中カルボキシル基生成効果とカテキン類の化学構造との関係について生理的条件下で検討し、ピロガロール型の水酸基を持つカテキン類はカテコール型の水酸基を持つカテキン類よりもカルボニル基を多く生成することを報告している。この結果を援用すると、茶飲料に含まれるカテキン類のフリーラジカル消去に伴うカルボニル基減少に拮抗してカテキン類自身による酸化促進効果が加わるので、総計としてのカルボニル基量は含有されるカテキン類個々の酸化抑制効果と酸化促進効果の総和となり、茶飲料中のカテキン類の組成の違いを反映したものとなる。

チロシナーゼはフェノール化合物を酸化し、キノン体などの酸化生成物を生じる。そこでカテキン類とチロシナーゼの共存下でウシ血清アルブミンをイ

ンキュベートしてウシ血清アルブミン中のSH基量とカルボニル基量を測定した。ウシ血清アルブミン中システイン-34に由来するSH基は、添加したカテキン類の濃度に依存して減少した(図3)ことから、チロシナーゼにより酸化されたカテキン類の酸化生成物はアルブミン中SH基と反応してその濃度を減少させたと推測される。SH基の減少の程度はピロガロール型の没食子酸エピガロカテキンが最も

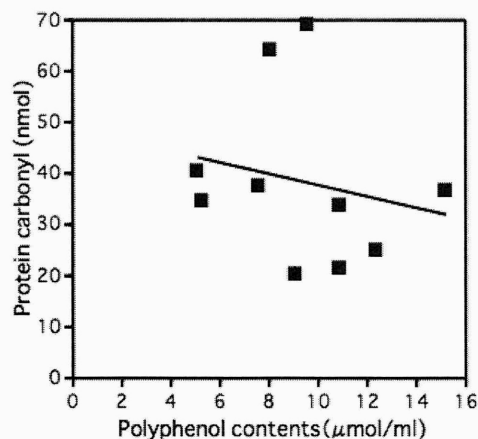


図2 AAPH 添加条件下で生じたウシ血清アルブミン中カルボニル基量と茶飲料中総ポリフェノール量との相関

カルボニル基量はウシ血清アルブミンに含まれる総量を示す。ポリフェノール量は茶飲料中の濃度を示す。

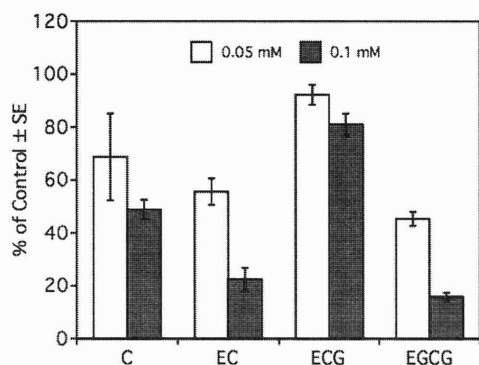


図3 カテキン類とチロシナーゼ共存下でのウシ血清アルブミン中SH基量の変化

カテキン類 (0.05および0.1 mM) とチロシナーゼ (150 units) を添加して90分間インキュベートした。反応液中ウシ血清アルブミンに残存するSH基量を対照群 (カテキン類無添加) の値に対する百分率で表した ($n=4-6$)。C, EC, ECG, EGCGはそれぞれ(+)-カテキン, (-)-エピカテキン, (-)-没食子酸エピカテキン, (-)-没食子酸エピガロカテキンを表す。

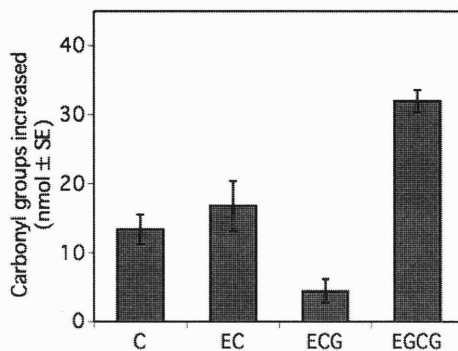


図4 カテキン類とチロシナーゼ共存下で増加したウシ血清アルブミン中カルボニル基量

カテキン類 (0.1 mM) とチロシナーゼ (150 units) を添加して90分間インキュベートした。反応液中ウシ血清アルブミンに増加したカルボニル基量を示す ($n=4$)。C, EC, ECG, EGCGはそれぞれ(+)-カテキン, (-)-エピカテキン, (-)-没食子酸エピカテキン, (-)-没食子酸エピガロカテキンを表す。

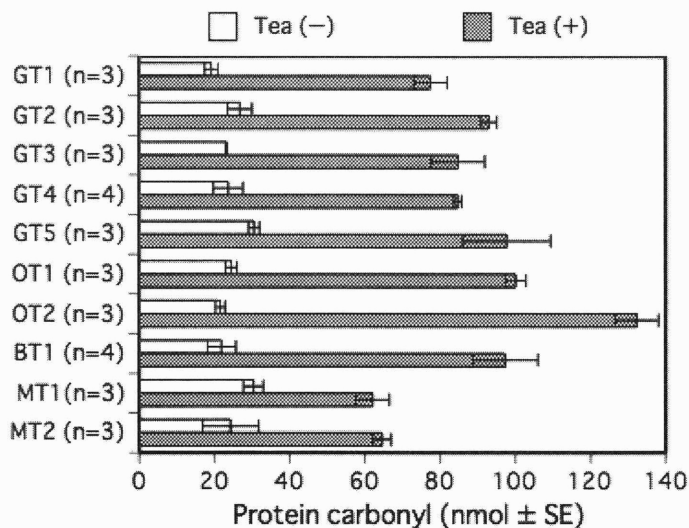


図5 茶飲料と Cu^{2+} イオン共存下で増加したウシ血清アルブミン中カルボニル基量

カルボニル基量はウシ血清アルブミン中に含まれる総量を示す。GT, OT, BT, MTはそれぞれ緑茶飲料, 烏龍茶飲料, 紅茶飲料, 混合茶飲料を表す。

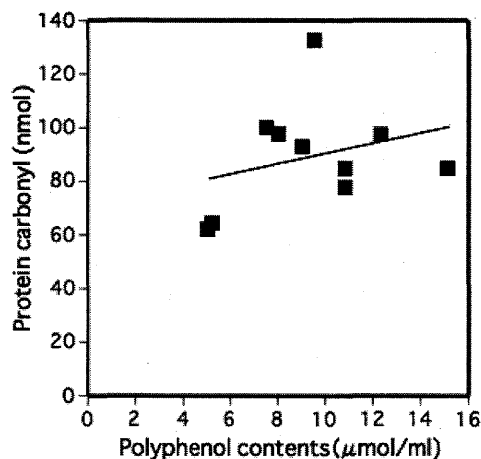


図6 茶飲料と Cu^{2+} イオン添加条件下で生じたウシ血清アルブミン中カルボニル基量と茶飲料中総ポリフェノール量との相関

カルボニル基量はウシ血清アルブミン中に生じた総量を示す。ポリフェノール量は茶飲料中の濃度を示す。

大きかった。一方、アルブミン中カルボニル基はSH基の減少と逆相関的にカテキン類 (0.1 mM) の添加により増加した (図4) ことから、カテキン類の酸化生成物はアルブミンの酸化を促進するといえる。したがって、半発酵茶系飲料や発酵茶系飲料にカルボニル基を大きく増加させる検体がみられたのは、これらの茶飲料に多く含まれるカテキン類の酸化生成物や重合体がタンパク質の酸化を促進したためと考えられる。

ところで、鉄や銅など遷移金属は、アスコルビン酸やカテキンなど還元性物質との共存下において、タンパク質の酸化を促進することが知られている^{7) 13) 15)}。今回用いた反応系において Cu^{2+} イオンは、単独添加ではカルボニル基量に影響を与えなかった。しかし、 Cu^{2+} イオンと茶飲料の共存下におけるタンパク質カルボニル基生成を検討したところ、すべての茶飲料は顕著にタンパク質カルボニル基を増加させた (図5)。最も弱い効果を示した混合茶飲料MT1で約2倍、最も強い効果を示した紅茶飲料BT1で約6倍にカルボニル基量が増加した。この条件下で生じたカルボニル基量と飲料中ポリフェノール量との相関性を検討したが、明確な相関性はみられなかった (図6)。 Cu^{2+} イオンはポリフェノール類を酸化してキノン体を生じると推定されている¹⁶⁾ ことを併せて考えると、タンパク質酸化を生じさせる要因としてポリフェノール類が関与するとして

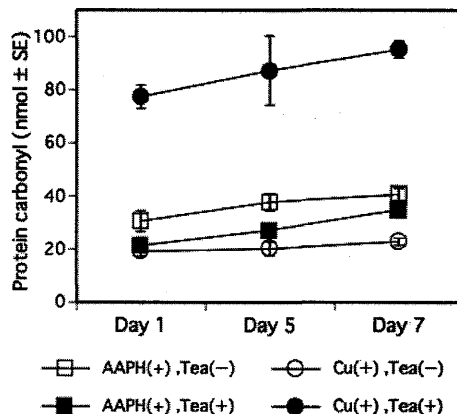


図7 開栓後の経過日数とウシ血清アルブミン中カルボニル基量の変動

緑茶飲料のボトルを開栓し、1, 5および7日目の試料を用いてウシ血清アルブミン中カルボニル基生成への影響を比較した。10 mM AAPHまたは0.1 mM CuCl_2 存在下におけるカルボニル基生成を緑茶飲料添加の有無で比較した。

も、その総量は酸化の決定因子ではなく、特定の化学構造を持つポリフェノール類またはそれらの酸化生成物がより重要であることを示す。

市販ペットボトル入り茶飲料は、大容量であれば開栓時に飲みきるとは限らない。そこで、GT1について、開栓して冷蔵庫内に放置した5および7日目におけるカルボニル基生成に対する添加効果を検討した (図7)。AAPH添加により生成するカルボニル基量に対するGT1の抑制効果は経日的に弱くなり、他方、 Cu^{2+} イオンとの共存下で生成するカルボニル基量は、経日的に増大する傾向を示した。このような変化にはポリフェノール類の自動酸化が関係し、茶飲料中ポリフェノール類の酸化に伴って茶飲料の示すフリーラジカル消去能は低下するが、生じたポリフェノール類の酸化体がアルブミンの酸化を促進した可能性がある。

本報告においては人工的な条件下ではあるが、抗酸化成分を多く含む茶飲料もタンパク質の酸化促進効果を示すことを明らかにし、これにはカテキン類の酸化生成物が関係する可能性を指摘した。しかし、このようなタンパク質の酸化が生理的条件下で起こり得るか、あるいは酸化されたタンパク質がどのような機能変化をもたらすのかの解明は今後の課題としてある。

謝辞

本研究の一部は平成21年度京都女子大学・京都女子短期大学部研究助成の補助を受けたものである。

IV 引用文献

- 1) 村松敬一郎, 小國伊太郎, 伊勢村護, 杉山公男, 山本(前田)万理. 編: 茶の機能—生体機能の新たな可能性, 学会出版センター (2002)
- 2) C. Cabrera, R. Artacho and R. Giménez: *J. Am. Coll. Nutr.*, **25**, 79-99 (2006)
- 3) F. Thielecke and M. Boschmann: *Phytochemistry* **70**, 11-24 (2009)
- 4) F. Hayakawa, T. Kimura, T. Maeda, M. Fujita, H. Sohmiya, M. Fujii and T. Ando: *Biochim. Biophys. Acta*, **1336**, 123-131 (1997)
- 5) S. Oikawa, A. Furukawa, H. Asada, K. Hirakawa and S. Kawanishi: *Free Radic. Res.*, **37**, 881-890 (2003)
- 6) G. Galati, A. Lin, A. M. Sultan and P. O'Brien: *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 570-580 (2006)
- 7) K. Nakagawa, M. Kaku, T. Abukawa, K. Aratani, M. Yamaguchi and S. Uesato: *J. Health Sci.*, **53**, 591-595 (2007)
- 8) B. Z. Zhu, W. E. Antholine and B. Frei: *Free Radic. Biol. Med.*, **32**, 1333-1338 (2002)
- 9) V. L. Singleton and J. A. Rossi: *Am. J. Enol. Vitic.*, **16**, 144-158 (1965)
- 10) Y. Kondo, M. Ohnishi and M. Kawaguchi: *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1781-1785 (1999)
- 11) M. L. Hu: *Methods Enzymol.*, **233**, 380-385 (1994)
- 12) 中川一夫, 中村章子, 松永博絵: 本誌, **57**, 33-37 (2002)
- 13) E. R. Stadtman: *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 797-821 (1993)
- 14) T. Ishii, T. Mori, T. Ichikawa, M. Kaku, K. Kusaka, Y. Uekusa, M. Akagawa, Y. Aihara, T. Furuta, T. Wakimoto, T. Kan and T. Nakayama: *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 4892-4896 (2010)
- 15) M. Kaku and K. Nakagawa: *J. Health Sci.*, **55**, 441-446 (2009)
- 16) M. Akagawa, T. Shigemitsu and K. Suyama: *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 8019-8024 (2005)